

DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-102-114



# Генетический ландшафт острых миелоидных лейкозов, протекающих с лейкоцитозом

К.А. Пехова<sup>1</sup>, Ю.В. Сидорова<sup>2</sup>, Н.А. Северина<sup>2</sup>, О.А. Глинщикова<sup>2</sup>, И.С. Февралева<sup>2</sup>, Б.В. Бидерман<sup>2</sup>, Ю.А. Чабаяева<sup>2</sup>, С.М. Куликов<sup>2</sup>, И.А. Лукьянова<sup>2</sup>, А.И. Кашлакова<sup>2</sup>, Т.Н. Обухова<sup>2</sup>, В.Н. Двирный<sup>2</sup>, А.Б. Судариков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ломоносовский пр-кт, 27, корп. 1;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

**Контакты:** Ксения Алексеевна Пехова [k.baranova1999@yandex.ru](mailto:k.baranova1999@yandex.ru)

**Введение.** Одно из проявлений пролиферации опухолевых клеток при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) – лейкоцитоз. В работе мы оцениваем ассоциацию отдельных мутаций с лейкоцитозом, а также их суммарный вклад в развитие лейкоцитоза при ОМЛ. Полученные результаты помогут лучше понять патогенетический механизм развития лейкоцитоза при ОМЛ.

**Цель исследования** – изучить генетический ландшафт ОМЛ, протекающих с лейкоцитозом.

**Материалы и методы.** Ретроспективно были исследованы лабораторные данные 214 пациентов с ОМЛ, наблюдавшихся в НИИЦ гематологии (Москва) с 2010 по 2022 г. Для выявления мутаций генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2*, химерных транскриптов *CBFB::MYH11* и *RUNX1::RUNX1T1* использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени, капиллярный электрофорез и секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS).

**Результаты.** Мутации гена *FLT3* (отношение шансов 5,45;  $p < 0,0001$ ), *inv(16)/CBFB::MYH11* (отношение шансов 10,03;  $p = 0,0009$ ) в наибольшей степени ассоциированы с лейкоцитозом  $> 30 \times 10^9/\text{л}$  в дебюте ОМЛ. Транслокация *t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1* и неблагоприятные цитогенетические нарушения, такие как  $-5/\text{del}(5q)$ ,  $-7/\text{del}(7q)$ ,  $-17/\text{abn}(17p)$ , комплексный и моносомный кариотип, статистически значимо ассоциированы с количеством лейкоцитов  $< 30 \times 10^9/\text{л}$  на момент манифестации заболевания ( $p < 0,0001$ ). У пациентов группы промежуточного цитогенетического риска только с мутациями генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A* и *TET2* было статистически значимо ниже количество лейкоцитов в дебюте ОМЛ, тогда как наиболее выраженные лейкоцитозы наблюдались у пациентов, имеющих сочетание драйверных мутаций, мутаций генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* и мутаций *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*.

**Заключение.** Помимо различного влияния отдельных генетических и цитогенетических нарушений на пролиферативный потенциал опухолевых клеток существует суммарный вклад разного типа генетических событий в развитие лейкоцитоза при ОМЛ. Высокие уровни лейкоцитов на момент манифестации ОМЛ у пациентов с промежуточным цитогенетическим риском могут служить косвенным маркером наличия большого количества генетических aberrаций и сочетания мутаций генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* и мутаций *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз, лейкоцитоз, мутационный профиль, мутации эпигенетических факторов, химерный транскрипт, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*

**Для цитирования:** Пехова К.А., Сидорова Ю.В., Северина Н.А. и др. Генетический ландшафт острых миелоидных лейкозов, протекающих с лейкоцитозом. Онкогематология 2023;18(3):102–114. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-102-114

## Genetic landscape of acute myeloid leukemias with leukocytosis

K.A. Pekhova<sup>1</sup>, Yu. V. Sidorova<sup>2</sup>, N.A. Severina<sup>2</sup>, O.A. Glinshchikova<sup>2</sup>, I.S. Fevrалева<sup>2</sup>, B.V. Biderman<sup>2</sup>, Yu.A. Chabaeva<sup>2</sup>, S.M. Kulikov<sup>2</sup>, I.A. Luk'yanova<sup>2</sup>, A.I. Kashlakova<sup>2</sup>, T.N. Obukhova<sup>2</sup>, V.N. Dvirnyk<sup>2</sup>, A.B. Sudarikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 1, 27 Lomonosovskiy Prospekt, Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

**Contacts:** Kseniya Alekseevna Pekhova [k.baranova1999@yandex.ru](mailto:k.baranova1999@yandex.ru)

**Background.** Tumor cell proliferation in acute myeloid leukemia (AML) may manifest with high leukocyte counts. In our work, we evaluate the association of high leukocyte counts with individual mutations, as well as their total contribution to the development of leukocytosis in AML. The results obtained should improve our understanding of pathogenic mechanisms leading to the leukocytosis in AML.

**Aim.** To study the genetic landscape of AML with leukocytosis.

**Materials and methods.** The laboratory data of 214 AML patients admitted to the National Medical Research Center for Hematology (Moscow) from 2010 to 2022 were retrospectively examined. Real-time PCR, capillary electrophoresis and NGS (next generation sequencing) methods were used to detect mutations of *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* genes, and *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1* chimeric gene transcripts.

**Results.** Mutations of the *FLT3* gene (odds ratio 5.45;  $p < 0.0001$ ), *inv(16)/CBFB::MYH11* (odds ratio 10.03;  $p = 0.0009$ ) are most associated with leukocyte counts higher than  $30 \times 10^9/L$  in the debut of AML. Translocation *t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1* and adverse cytogenetic aberrations, such as *-5/del(5q)*; *-7/del(7q)*; *-17/abn(17p)*, complex and monosomic karyotype were significantly associated with leukocyte counts lower than  $30 \times 10^9/L$  at the time of disease manifestation ( $p < 0.0001$ ). In the group of patients with intermediate cytogenetic risk bearing only *IDH1/2*, *DNMT3A*, and *TET2* gene mutations, leukocyte counts at AML debut were significantly lower, whereas the most pronounced leukocytosis was observed in patients with a combination of driver mutations with *IDH1/2*, *DNMT3A*, and *TET2* gene mutations or *FLT3*, *NPM1*, and *CEBPA* gene mutations.

**Conclusion.** In addition to the individual effect of certain genetic lesions and cytogenetic aberrations on the proliferative potential of tumor cells, there is a total contribution of various types of genetic events to the development of leukocytosis in AML. High leukocyte counts at the time of AML manifestation in patients with intermediate cytogenetic risk can serve as an indirect marker of the presence of a large number of genetic aberrations with a combination of *IDH1/2*, *DNMT3A*, and *TET2* gene mutations or *FLT3*, *NPM1*, and *CEBPA* gene mutations.

**Keywords:** acute myeloid leukemia, leukocytosis, mutational profile, mutations of epigenetic factors, chimeric transcripts, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*

**For citation:** Pekhova K.A., Sidorova Yu.V., Severina N.A. et al. Genetic landscape of acute myeloid leukemias with leukocytosis. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2023;18(3):102–14. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-102-114

## Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — наиболее распространенный острый лейкоз среди взрослых. Заболеваемость в России достигает 1,32 случая на 100 тыс. населения [1]. Патофизиология заболевания связана с цитогенетическими аномалиями, генными мутациями и aberrантной экспрессией генов. ОМЛ — фенотипически и генетически гетерогенное заболевание.

Современная классификация Всемирной организации здравоохранения (2022) подразделяет ОМЛ на отдельные нозологические группы в зависимости от цитогенетических и молекулярно-генетических аномалий [2]. Молекулярно-генетические особенности ОМЛ лежат в основе стратификации больных на группы риска и определения тактики лечения (табл. 1) [3].

Такие хромосомные aberrации, как *t(6;9)(p23;q34.1)*, *DEK::NUP214*, моносомный кариотип, *-5/del(5q)*, *-7/del(7q)*, *-17/abn(17p)*, *inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)*, транслокации с участием гена *KMT2A (MLL)*, кроме *t(9;11)(p21.3;q23.3)*, *t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1*, комплексный кариотип, мутации в генах *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1* являются факторами неблагоприятного прогноза. Наоборот, наличие таких хромосомных аномалий, как *t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1* и *inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11*, определяет благоприятный прогноз [3–6].

Если при цитогенетическом исследовании определяются аномалии промежуточного риска или нормальный кариотип, то группу прогноза определяют по мутациям в генах *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*,

*ASXL1*, *TP53* (см. табл. 1). Наличие мутации *NPM1* или биаллельной мутации *CEBPA* позволяет отнести пациента в группу благоприятного риска, однако мутации *FLT3-ITD* (внутренняя tandemная дупликация) ухудшают прогноз пациента, так как ассоциированы с высоким риском развития рецидива [7–9].

При стратификации пациентов на группы риска имеет значение не только наличие мутации *FLT3-ITD*, но и величина аллельного отношения мутантного типа к «дикому», которая отражает количество клеток с мутацией или мутантного аллеля [10–12]. При аллельной нагрузке  $>0,5$  (*FLT3-ITD<sup>high</sup>*) и отсутствии мутации *NPM1* прогноз определяется как неблагоприятный [13, 14].

Основные принципы классификации были перенесены в новую классификацию групп риска ОМЛ ELN (2022), в которой спектр мутаций неблагоприятного прогноза существенно расширился [15]. Несмотря на это, множество мутационных изменений и их сочетаний, этапность их возникновения, а также большое количество других клиничко-лабораторных прогностических факторов при ОМЛ не может вместить ни одна из современных классификаций. В настоящее время очевидно, что в гемопоэтических стволовых клетках возникают различные типы мутаций, которые дополняют друг друга и взаимодействуют в лейкемогенезе [16, 17].

В последние годы мутации делят на несколько больших функциональных типов:

- мутации I типа, обеспечивающие пролиферацию и жизнеспособность опухолевых клеток. Это мутации

Таблица 1. Молекулярно-генетическая стратификация больных острым миелоидным лейкозом по группам риска ELN (2017) [3]  
Table 1. 2017 ELN risk stratification of AML patients by genetics [3]

Генетическая группа Genetic group	Описание Description
Благоприятная Favorable	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(8;21)(q22;q22), <i>RUNX1::RUNX1T1</i></li> <li>inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22), <i>CBFB::MYH11</i></li> <li>Мутация <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup></li> <li>Биаллельная мутация <i>CEBPA</i></li> <li>t(8;21)(q22;q22), <i>RUNX1::RUNX1T1</i></li> <li>inv(16)(p13.1;q22), t(16;16)(p13.1;q22), <i>CBFB::MYH11</i></li> <li><i>NPM1</i> mutation without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup></li> <li>Biallelic <i>CEBPA</i> mutation</li> </ul>
Промежуточная Intermediate	<ul style="list-style-type: none"> <li>Мутация <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li>«Дикий» тип <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup> (без генетических нарушений, относящихся к неблагоприятным)</li> <li>t(9;11)(p21.3;q23.3), <i>MLLT3::KMT2A</i></li> <li>Цитогенетические аномалии, не классифицируемые как благоприятные или неблагоприятные</li> <li><i>NPM1</i> mutation with <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li><i>NPM1</i> wild type without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i><sup>low</sup> (no unfavorable genetic aberrations)</li> <li>t(9;11)(p21.3;q23.3), <i>MLLT3::KMT2A</i></li> <li>Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or unfavorable</li> </ul>
Неблагоприятная Unfavorable	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(6;9)(p23;q34.1), <i>DEK::NUP214</i></li> <li>t(v;11q23.3), перестройка <i>KMT2A</i></li> <li>t(9;22)(q34.1;q11.2), <i>BCR::ABL1</i></li> <li>inv(3)(q21.3;q26.2), t(3;3)(q21.3;q26.2), <i>GATA2::MECOM(EVI1)</i></li> <li>-5/del(5q), -7/del(7q), -17/abn(17p)</li> <li>Комплексный кариотип, моносомный кариотип</li> <li>«Дикий» тип <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li>Мутация <i>RUNX1</i>, <i>ASXL1</i>, <i>TP53</i></li> <li>t(6;9)(p23;q34.1), <i>DEK::NUP214</i></li> <li>t(v;11q23.3), <i>KMT2A</i> rearrangement</li> <li>t(9;22)(q34.1;q11.2), <i>BCR::ABL1</i></li> <li>inv(3)(q21.3;q26.2), t(3;3)(q21.3;q26.2), <i>GATA2::MECOM(EVI1)</i></li> <li>-5/del(5q), -7/del(7q), -17/abn(17p)</li> <li>Complex karyotype, monosomic karyotype</li> <li><i>NPM1</i> wild type and <i>FLT3-ITD</i><sup>high</sup></li> <li><i>RUNX1</i>, <i>ASXL1</i>, <i>TP53</i> mutation</li> </ul>

генов сигнальных путей (*FLT3*, *c-KIT*, *NRAS/KRAS*, *NOTCH1/2*, *PTPN1*, *CBL* и др.);

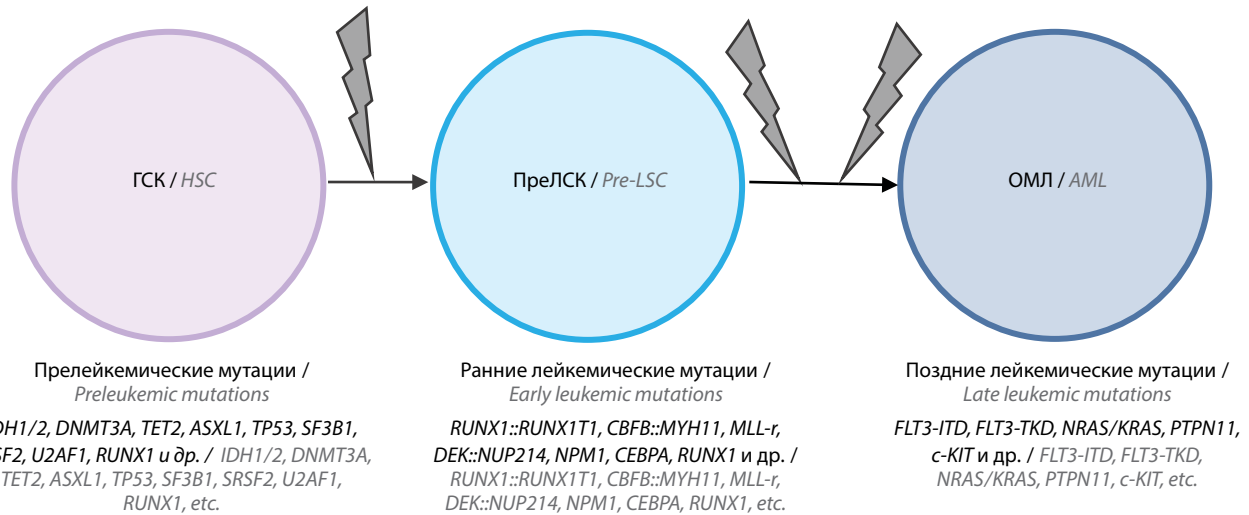
- мутации II типа, влияющие на дифференцировку и апоптоз клеток (*CEBPA*, *GATA1/2*, *RUNX1*, *NPM1*, *TP53*, а также гены, возникшие путем слияния: *MLL(KMT2A)-r*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *PML::RARA* и др.);
- мутации III типа — мутации в генах эпигенетической регуляции/модификации (*IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *HDACs*, *WT1*, *UTX*, *EZH2*, *ASXL1*, *BCOR*, *MLL-PTD* и др.).

В отдельные группы относят мутации в генах, кодирующих белки РНК-сплайсинга (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *U2AF2* и др.) и белки когезина — комплекса, участвующего в делении сестринских хроматид (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3* и др.), белки клеточной адгезии (кадгерины, интегрины), *ICAMs*, *CXCR4* и др. [18–20].

Многoletние исследования привели нас к пониманию, что процесс приобретения мутаций гемопоэтической стволовой клеткой носит последовательный характер. Ученым удалось выделить прелейкемическую стадию развития ОМЛ, так называемую прелейкемию.

Данный термин был впервые использован в 1953 г. М. Block и соавт. и обозначал заболевания, которые мы сейчас относим к миелодиспластическим синдромам [21]. Сегодня термином «прелейкемия» принято называть цепочку любых мутационных событий, которые предшествуют, а главное — способствуют развитию острого лейкоза [22, 23]. Первичные (прелейкемические) мутации — это, как правило, мутации эпигенетических регуляторов (III типа), которые сдвигают пролиферативную активность гемопоэтических стволовых клеток в сторону самообновления, что приводит к накоплению патологического клона в костном мозге и периферической крови; последующие мутации I и II типов, драйверные мутации, непосредственно вызывают развитие острого лейкоза (рис. 1) [24–26]. Классическая теория «двух ударов» А. Кнудсона оказывается лишь частично верной для ОМЛ, так как существенно большее количество мутационных событий и гетерогенный состав опухоли говорят о «многоударном» процессе онкогенной трансформации при ОМЛ.

К наиболее частым прелейкемическим мутациям при ОМЛ относят мутации генов *DNMT3A* (15–25 %),



**Рис. 1.** Этапность возникновения мутаций при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). ГСК — гемопоэтическая стволовая клетка; преЛСК — пре-лейкемическая стволовая клетка

**Fig. 1.** Stages of mutation occurrence in acute myeloid leukemia (AML). HSC — hematopoietic stem cells; pre-LSC — pre-leukemic stem cells

*TET2* (8–12 %), *IDH1* (8–19 %), *IDH2* (7–14 %) [6, 15, 16]. Мутации *DNMT3A* и *TET2* играют ведущую роль в структуре клонального гемопоэза у пожилых людей [27]. Наиболее частые драйверные мутации при ОМЛ — это инверсии и транслокации с образованием химерных транскриптов *CBFB::MYH11* (5–8 %), *RUNX1::RUNX1T1* (4–5 %), мутации с тандемной дупликацией гена *FLT3* (*FLT3-ITD*) (20–5 %) или аминокислотной заменой в киназном домене рецептора *FLT3* (*FLT3-TKD*) (5–7 %), мутации генов *NPM1* (27–35 %) и *CEBPA* (5–6 %) [15, 16]. Известна частая ассоциация мутаций *IDH1/2*, *DNMT3A*, *FLT3*, *NPM1* [6].

Одно из проявлений пролиферации опухолевых клеток при ОМЛ — лейкоцитоз — возникновение большого количества лейкоцитов в периферической крови, в первую очередь за счет незрелых, бластных клеток. Разные авторы определяют гиперлейкоцитоз как абсолютное количество лейкоцитов  $>100 \times 10^9/\text{л}$  при ОМЛ и  $>50 \times 10^9/\text{л}$  при остром промиелоцитарном лейкозе. Гиперлейкоцитоз ухудшает прогноз пациента, поскольку запускает ряд патогенетических механизмов и может приводить к ДВС-синдрому, лейкостазу и синдрому лизиса опухоли [28–31]. При лейкоцитозе  $>30 \times 10^9/\text{л}$  пациентам показано проведение профилактики нейрорлейкемии [1]. На сегодняшний день доказана связь некоторых генетических событий с развитием гиперлейкоцитоза и лейкоцитоза при ОМЛ. Показано, что среди пациентов с гиперлейкоцитозом/лейкоцитозом чаще встречаются больные с миеломоноцитарным подтипом лейкоза, мутациями *NPM1* и *FLT3-ITD*, инверсией хромосомы 16, а также с хромосомной аномалией 11q23 [8, 32–34]. С другой стороны, в целом ряде исследований показано отрицательное влияние гиперлейкоцитоза и лейкоцитоза на долгосрочные показатели выживаемости при ОМЛ как в общей когорте пациентов, так и в группе благоприятного/промежуточного риска [8, 33–36].

Поскольку патогенез лейкоцитоза при ОМЛ остается объектом пристального научного внимания, мы исследовали генетический профиль ОМЛ, протекающих с лейкоцитозом.

**Цель исследования** — оценка ассоциации лейкоцитоза с наиболее частыми цитогенетическими и генетическими аномалиями.

### Материалы и методы

**Пациенты.** В исследование включен материал 214 пациентов с ОМЛ, наблюдавшихся в НМИЦ гематологии (Москва) с 2010 по 2022 г. Возраст пациентов составил 18–75 лет, медиана — 44 года.

Критерии включения: подтвержденный ОМЛ, кроме острого промиелоцитарного лейкоза, наличие данных цитогенетического исследования, молекулярно-генетического исследования генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *DNMT3A* и *TET2* или обнаруженные химерные транскрипты *CBFB::MYH11* и *RUNX1::RUNX1T1* или наличие архивных образцов ДНК и РНК, позволяющих выполнить исследования данных мутаций. Группы благоприятного, промежуточного, неблагоприятного риска определяли по классификации ELN (2017) [3]. За лейкоцитоз принимали содержание лейкоцитов в периферической крови  $>30 \times 10^9/\text{л}$  на момент манифестации заболевания. Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в табл. 2.

**Исследование мутаций генов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *FLT3-TKD* методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции.** Точечные мутации генов *DNMT3A* (p.R882H/C/S/P/L), *IDH1* (p.R132H, p.R132C/G/S), *IDH2* (p.R140Q, p.R172K), *FLT3-TKD* (p.D835Y) определяли методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени (табл. 3) на приборе StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, США).

**Исследование мутаций генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* методом капиллярного электрофореза.** Для амплификации



**Таблица 2.** Распределение пациентов по количеству лейкоцитов в зависимости от группы риска и выявленных генетических и цитогенетических аномалий ( $n = 214$ ),  $n$  (%)Table 2. Distribution of patients according to the leukocytes number depending on the risk group and identified genetic and cytogenetic abnormalities ( $n = 214$ ),  $n$  (%)

Показатель Parameter	Лейкоциты $<30 \times 10^9/\text{л}$ ( $n = 125$ (58 %)) Leukocytes $<30 \times 10^9/\text{L}$ ( $n = 125$ (58 %))	Лейкоциты $>30 \times 10^9/\text{л}$ ( $n = 89$ (42 %)) Leukocytes $>30 \times 10^9/\text{L}$ ( $n = 89$ (42 %))
Риск по классификации ELN 2017: 2017 ELN risk groups:		
благоприятный favorable	54 (52)	49 (48)
промежуточный intermediate	37 (61)	24 (39)
неблагоприятный unfavorable	34 (68)	16 (32)
<b>Цитогенетические aberrации и данные молекулярного исследования</b> Cytogenetic aberrations and molecular evidence		
Группа благоприятного риска: Favorable risk group:		
t(8;21)(q22;q22), <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	22 (73)	8 (26)
inv(16)(p13.1q22), <i>CBFB::MYH11</i>	6 (24)	19 (76)
мутация в гене <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup> <i>NPM1</i> mut without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup>	23 (52)	21 (48)
биаллельная мутация <i>CEBPA</i> biallelic <i>CEBPA</i> mutation	3 (75)	1 (25)
Группа промежуточного риска: Intermediate risk group:		
(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3::KMT2A</i>	1 (33)	2 (66)
мутации в генах <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> <i>NPM1</i> or <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> mutations	2 (18)	9 (82)
«дикий» тип <i>NPM1</i> без мутации <i>FLT3-ITD</i> или с мутацией <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup> <i>NPM1</i> wild type without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> <sup>low</sup>	0	3 (100)
не классифицированные цитогенетические и/или молекулярные аномалии cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or unfavorable	34 (79)	9 (21)
Группа неблагоприятного риска: Unfavorable risk group:		
комплексный или моносомный кариотип complex karyotype, monosomic karyotype	13 (100)	0
-5/del(5q), -7/del(7q), -17/abn(17p)	15 (94)	1 (6)
«дикий» тип <i>NPM1</i> и мутация в гене <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> <i>NPM1</i> wild type and <i>FLT3-ITD</i> <sup>high</sup> mutation	0	10 (100)
t(v;11q23.3), перестройка <i>KMT2A</i> t(v;11q23.3), <i>KMT2A</i> rearrangement	4 (67)	2 (33)
другое, в том числе сочетанные аномалии other, including combined abnormalities	2 (40)	3 (60)

таргетных последовательностей генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* использовали праймеры с флуоресцентной меткой FAM, последовательности которых были опубликованы ранее [37–39]. Капиллярный электрофорез высокого разрешения проводили на генетическом анализаторе «НАНОФОР-05» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Флуоресценцию и распределение амплификатов по длине оценивали с помощью компьютерной программы GeneMapper v.4 (Applied Biosystems, США). Аллельное отношение определяли как отношение площади мутантного пика к «дикому».

**Исследование химерных транскриптов *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*.** Исследование транскриптов вы-

полняли с помощью методов, опубликованных ранее, на приборе StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, США) [40].

**Секвенирование нового поколения (next generation sequencing, NGS).** У 92 из 205 пациентов было выполнено таргетное секвенирование *DNMT3A* (экзоны 7–23), *FLT3* (экзоны 13–16, 20), *IDH1* (экзон 4), *IDH2* (экзон 4), *NPM1* (экзоны 11–12), *TET2* (3–11) по технологии HEAT-SEQ (Roche, США) с панелью Myeloseq\_HEAT (Roche, США) на приборе MiSeq (Illumina, США) [41].

**Цитогенетическое исследование.** Стандартное цитогенетическое исследование G-дифференциально окрашенных хромосом клеток аспирата костного мозга проводили после краткосрочного культивирования

**Таблица 3.** Последовательности праймеров для определения точечных соматических мутаций *DNMT3A*, *IDH1/2*, *FLT3-TKD* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В скобках указаны нуклеотиды *LNA* (замкнутая нуклеиновая кислота)

**Table 3.** Primer sequences for detection of point somatic mutations *DNMT3A*, *IDH1/2*, *FLT3-TKD* by real-time polymerase chain reaction. *LNA* (locked nucleic acids) nucleotides are noted in brackets

Мишень Target	Прямые праймеры (5'–3') Direct primers (5'–3')	Обратные праймеры и проба (5'–3') Reverse primers and probe (5'–3')
<i>DNMT3A</i> p.R882	CGTCTCCAACATGAGCCG	Fam-CTCCATGACCGGCCAGCAGTC-BHQ1 CAGCGGAGCGAAGAGGTG
<i>DNMT3A</i> p.R882H	CGTCTCCAACATGAGCC(A)	
<i>DNMT3A</i> p.R882C	CGTCTCCAACATGAGCT	
<i>DNMT3A</i> p.R882S	CGTCTCCAACATGAGCA	
<i>DNMT3A</i> p.R882P	CGTCTCCAACATGAGCC(C)	
<i>DNMT3A</i> p.R882L	CGTCTCCAACATGAGCCT	
W1- <i>IDH1</i> p.R132	GTAAACCTATCATCATAGGT(C)	Fam-CATGCTTATGGGGATCAAGTAAGT-CATG-BHQ1 ACATGCAAAATCACATTATTGCCA
<i>IDH1</i> p.R132C	GTAAACCTATCATCATAGGT(T)	
W2- <i>IDH1</i> p.R132	GTAAACCTATCATCATAGGTC(G)	
<i>IDH1</i> p.R132H	GTAAACCTATCATCATAGGTC(A)	
<i>IDH2</i> p.R140	AAAGTCCCAATGGAACATCA(G)	Fam-ATCTGCAAAAACATCCAC-GCCTAGTCC-BHQ1 TGGTGATGGGCTTGGTCCA
<i>IDH2</i> p.R140Q	AAAGTCCCAATGGAACATCA(A)	
<i>IDH2</i> p.R172	AAGCCCATCACCATTGGCTG	Fam-ATGGCGACCAGGTAGGC-CAGGGTGGAGA-BHQ1 GTGCCCAGGTCAGTGGATC
<i>IDH2</i> p.R172K	AAGCCCATCACCATTGGCTA	
<i>Flt3</i> p.D835	CATAGTTGGAATCACTCATGATAGC	Fam-ATATCTTCACCACTTTCCC-GTGGGTGA-RTQ1 TCCATCACCGGTACCTCCTA
<i>Flt3</i> p.D835Y	CATAGTTGGAATCACTCATGATAGA	

согласно стандартному протоколу. По возможности анализировали 20 метафаз. Хромосомы классифицировали в соответствии с критериями Международной цитогеномной номенклатуры [42, 43]. Исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* выполняли с использованием коммерческих ДНК-зондов для выявления t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1::RUNX1T1*, inv(16)(p13.1q22)/*CBFB::MYH11*, inv(3)(q21;q26.2)/*GATA2::MECOM*, t(11q23;q)/*KMT2A*, -7/del(7q), -5/del(5q) в зависимости от результатов стандартного цитогенетического и морфологического исследований. Гибридизацию проводили согласно инструкциям фирм-производителей.

**Статистическая обработка данных.** Для оценки полученных данных использовали стандартные методы описательной статистики и частотного анализа. Для проверки гипотез о различиях распределений категориального признака (наличие лейкоцитоза) в группах сравнения по мутационному статусу использовали анализ таблиц сопряженности. Для оценки значимости применяли двусторонний критерий Фишера, в качестве меры связи приведено отношение шансов (ОШ) с соответствующим 95 % доверительным интервалом (ДИ). Для анализа совместного влияния отдельных

мутаций на лейкоцитоз применяли методы многофакторной логистической регрессии с пошаговым отбором.

Для проверки гипотез о наличии различий в распределениях числовых показателей (уровень лейкоцитов) в группах сравнения по мутационному статусу использовали непараметрический ранговый критерий Краскела–Уоллиса. Для проверки гипотезы о наличии взаимосвязи числовых показателей (аллельное отношение и количество лейкоцитов) применяли коэффициент корреляции Спирмена и U-критерий Манна–Уитни. Анализ проводили с помощью пакета SAS 9.4 (SAS Institute Inc., США).

### Результаты

Лейкоцитоз  $>30 \times 10^9/\text{л}$  был выявлен у 89 (42 %) из 214 пациентов (см. табл. 2). Частота встречаемости лейкоцитозов в группах риска по классификации ELN (2017) не была статистически значимой ( $p > 0,05$ ). В группах благоприятного, промежуточного, неблагоприятного риска доля пациентов с количеством лейкоцитов  $>30 \times 10^9/\text{л}$  составила 48, 39 и 32 % соответственно. Снижение доли лейкоцитозов в группе неблагоприятного риска наблюдалось за счет пациентов

с -5/del(5q), -7/del(7q), -17/abn(17p), комплексным и моносомным кариотипом, которые в 96,5 % (28 из 29) случаев имели количество лейкоцитов  $<30 \times 10^9/\text{л}$ . Была показана статистическая разница в числе пациентов с лейкоцитозом и без него в группах с соответствующим цитогенетическим статусом ( $p < 0,001$ ). Количество лейкоцитов у пациентов ( $n = 9$ ) с перестройками *KMT2A* (*MLL*) существенно варьировало от 1,7 до  $97 \times 10^9/\text{л}$  (медиана  $19,3 \times 10^9/\text{л}$ ). Группа пациентов с inv(16), в отличие от транслокации t(8;21), ассоциировалась с высоким количеством лейкоцитов. Результаты подробно обсуждаются далее (см. группы с химерными транскриптами *CBFB::MYH11* и *RUNX1::RUNX1T1*).

**Ассоциация отдельных мутаций с лейкоцитозом.** При оценке связи отдельных мутаций с лейкоцитозом  $>30 \times 10^9/\text{л}$  была обнаружена достоверная ассоциация лейкоцитоза с мутацией *FLT3* (ОШ 4,58;  $p = 0,0001$ ), но не с мутациями в генах *NPM1* (ОШ 1,74;  $p = 0,0784$ ) и *CEBPA* (ОШ 1,35;  $p = 0,6994$ ) (рис. 2). Лейкоцитоз значимо чаще встречался среди пациентов с подтвержденной мутацией *FLT3*, чем среди пациентов без нее (63,5 % против 29,5 %;  $p < 0,0001$ ). Можно также отметить, что при наличии мутации *NPM1* доля пациентов с лейкоцитозом составила 45 %, при ее отсутствии – 35 % ( $p = 0,0825$ ), а в случае мутации *CEBPA* – 46 и 40 % при ее наличии и отсутствии соответственно ( $p = 0,7518$ ).

Мутации генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A* не были ассоциированы с высокими уров-

нями лейкоцитов (ОШ 0,99;  $p = 0,9818$  и ОШ 1,62;  $p = 0,2326$  соответственно) (см. рис. 2). Лейкоцитоз встречался у 39 % пациентов в случае наличия мутации и у 37 % при ее отсутствии ( $p = 1,0000$ ). При наличии мутации *DNMT3A* лейкоцитоз выявлялся чаще, чем при ее отсутствии, однако различия между группами не были статистически значимыми (53 % против 33 %;  $p = 0,2947$ ).

Инверсия хромосомы 16 с образованием химерного транскрипта *CBFB::MYH11* статистически значимо была ассоциирована с лейкоцитозом (ОШ 15,83;  $p = 0,0001$ ), тогда как транслокация t(8;21)(q22;q22) с образованием транскрипта *RUNX1::RUNX1T1* продемонстрировала связь с количеством лейкоцитов  $<30 \times 10^9/\text{л}$  (ОШ 0,06;  $p = 0,0001$ ) (см. рис. 2). Среди пациентов с химерным транскриптом *CBFB::MYH11* лейкоцитоз встречался в 80 % случаев, без него – в 23 % ( $p < 0,0001$ ); среди пациентов с химерным транскриптом *RUNX1::RUNX1T1*, наоборот, – 23 и 80 % соответственно ( $p < 0,0001$ ).

По результатам многофакторной логистической регрессии с пошаговым отбором в качестве наиболее значимых были отобраны следующие факторы: мутация *FLT3* и химерный транскрипт *CBFB::MYH11* (табл. 4). По результатам однофакторного частотного анализа мутация *NPM1* слабо ассоциирована с лейкоцитозом ( $p = 0,0784$ ) (см. рис. 2) и не была отобрана в модель, так как не достигла необходимого порогового уровня значимости. Таким образом, наши результаты



Рис. 2. Результаты однофакторного частотного анализа, демонстрирующие ассоциацию отдельных мутаций с лейкоцитозом  
Fig. 2. Results of univariate analysis that demonstrate the association of individual mutations and leukocytosis

Таблица 4. Результаты многофакторного частотного анализа с пошаговым отбором факторов. Показаны только мутации, статистически значимо ассоциированные с лейкоцитозом  
Table 4. Results of multivariate frequency analysis with stepwise selection of factors. Only mutations statistically significantly associated with leukocytosis are shown

Фактор Factor	Отношение шансов Odds ratio	95 % доверительный интервал 95 % confidence interval	p
<i>FLT3</i>	5,45	2,64–11,22	<0,0001
<i>CBFB::MYH11</i>	10,03	2,59–38,84	0,0009

находятся в соответствии с данными других исследователей [14–16] о частой ассоциации *FLT3* и *CBFB::MYH11* с лейкоцитозом. Однако мы не обнаружили связи мутаций в генах *CEBPA*, *IDH1/2*, *DNMT3A* по отдельности с развитием лейкоцитоза.

**Ассоциация аллельного отношения мутации *FLT3-ITD* с лейкоцитозом.** Мы проанализировали взаимосвязь между количеством лейкоцитов и аллельным отношением *FLT3-ITD* у 44 пациентов. Статистически значимой корреляции не обнаружено (коэффициент корреляции Спирмена 0,45;  $p = 0,0019$ ). Диаграмма регрессионной зависимости представлена на рис. 3.

**Ассоциация генетического профиля ОМЛ с лейкоцитозом.** Для оценки сочетанной ассоциации мутаций с пролиферативным потенциалом опухолевых клеток у пациентов без выявленных химерных транскриптов ( $n = 150$ ) мы исследовали 4 группы с разным мутационным профилем:

- группа 1 — пациенты без выявленных нижеперечисленных мутаций;
- группа 2 — пациенты с мутациями генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A* и *TET2*;

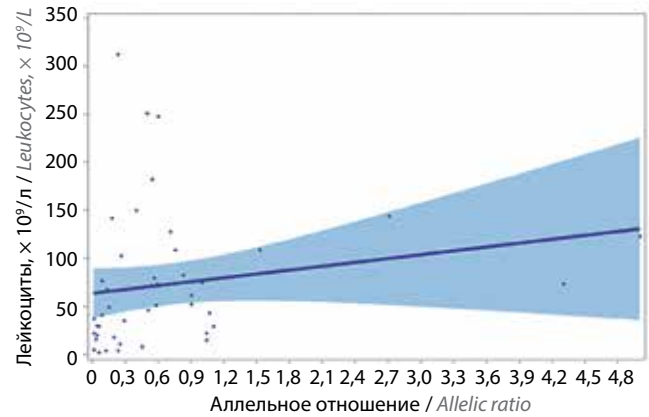


Рис. 3. Диаграмма регрессионной зависимости аллельного отношения *FLT3-ITD* от количества лейкоцитов

Fig. 3. Regression diagram of the *FLT3-ITD* allelic ratio and leukocytes

- группа 3 — пациенты только с мутациями *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, *NPM1* и *CEBPA*;
- группа 4 — пациенты с мутациями обоих видов: генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A* и *TET2* и мутациями *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, *NPM1* и *CEBPA* (рис. 4).

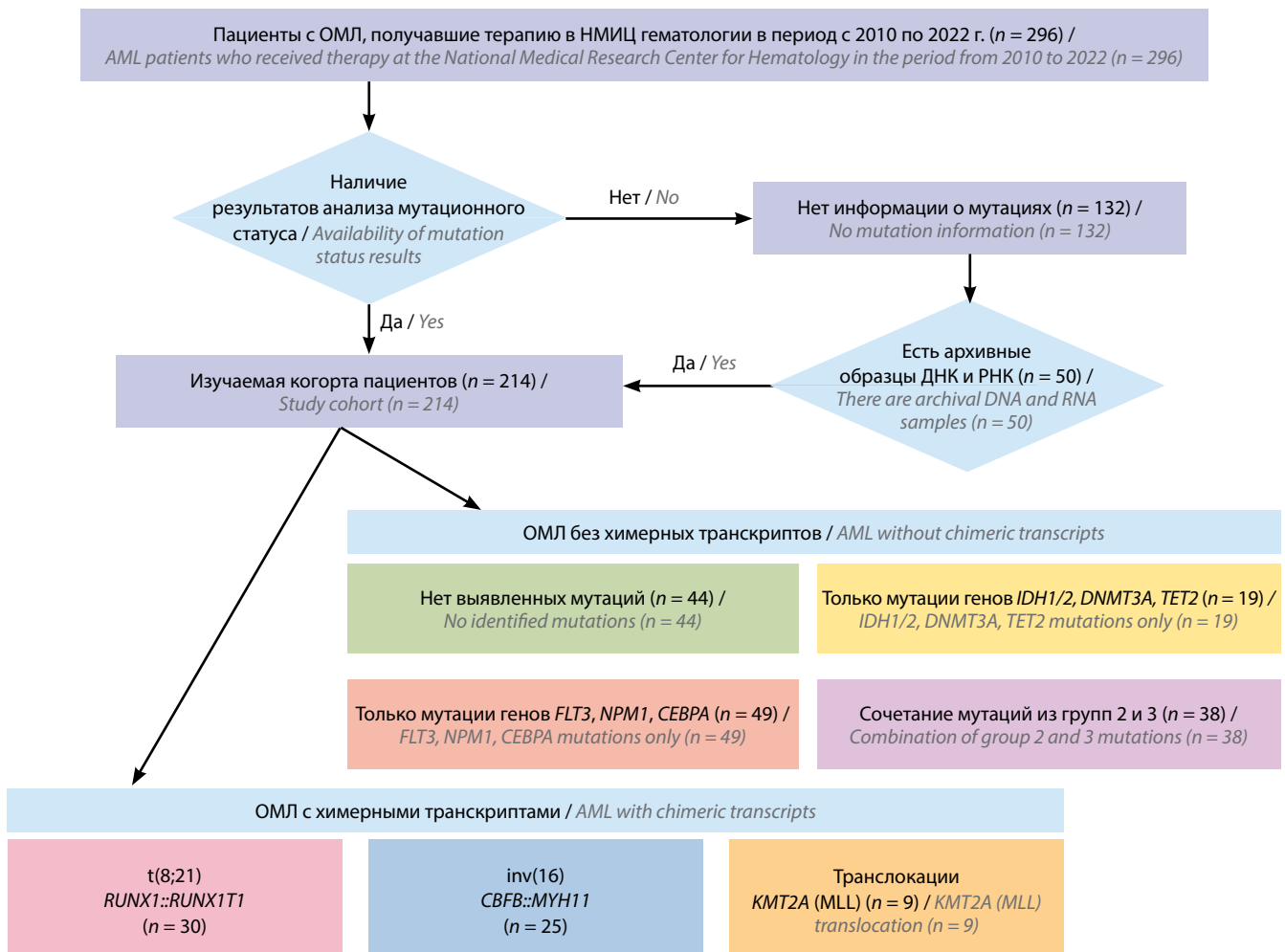


Рис. 4. Дизайн исследования. ОМЛ — острый миелоидный лейкоз  
Fig. 4. Study design. AML — acute myeloid leukemia



Спектр выявленных мутаций в данной когорте пациентов представлен на рис. 5.

Уровни лейкоцитов ниже всего были в группе пациентов, имеющих только мутации генов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* (медиана  $4,68 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $2,12-18,06 \times 10^9/\text{л}$ ), близкие значения отмечены в группе пациентов, в которой исследованные мутации не выявлены (медиана  $6,19 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $4,60-8,99 \times 10^9/\text{л}$ ). Наибольшие уровни лейкоцитов продемонстрировала группа пациентов с сочетанием мутаций генов эпигенетических факторов и мутаций генов *FLT3*, *NPM1* и *CEBPA* (медиана  $49,21 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $25,00-83,00 \times 10^9/\text{л}$ ) (рис. 6, а).

Отдельно из данной когорты были выделены пациенты ( $n = 84$ ) с кариотипом промежуточного риска, т. е. с нормальным кариотипом и не классифициро-

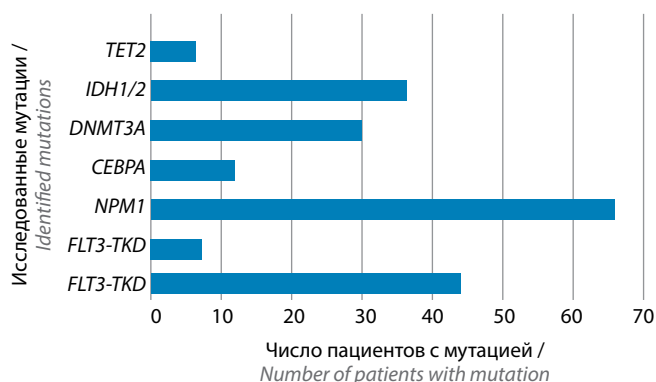


Рис. 5. Количество выявленных мутаций у пациентов без химерных транскриптов

Fig. 5. The number of identified mutations in patients without chimeric transcripts

ванными цитогенетическими аномалиями. В этой группе получены аналогичные значения: наиболее низкие уровни лейкоцитов наблюдались у пациентов с мутациями *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* (медиана  $3,70 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $0,96-10,64 \times 10^9/\text{л}$ ), пациенты без выявленных мутаций имели несколько большие уровни лейкоцитов (медиана  $6,30 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $10,59-40,83 \times 10^9/\text{л}$ ), однако в группах 3 и 4 (см. рис. 4) количество лейкоцитов было значительно больше (медиана  $23,78 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $28,92-59,70 \times 10^9/\text{л}$  и медиана  $47,00 \times 10^9/\text{л}$ ; 95 % ДИ  $47,31-93,52 \times 10^9/\text{л}$  соответственно) (рис. 6, б).

Отдельного обсуждения требует группа пациентов без выявленных мутаций *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2*, *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, в которой наблюдался существенный разброс уровней лейкоцитов. Эта группа объединяет пациентов с более редкими генетическими и цитогенетическими нарушениями, которые подлежат дальнейшему изучению в целях получения адекватных статистических данных.

Во всех случаях различия в количестве лейкоцитов между группами с разным генетическим профилем, посчитанные с помощью критерия Краскела–Уоллиса, были статистически значимыми ( $p < 0,0001$ ).

## Обсуждение

Мы изучили связь лейкоцитоза у пациентов с ОМЛ с наиболее частыми генетическими и цитогенетическими нарушениями. Лейкоцитоз ассоциировался с наличием у пациента инверсии хромосомы 16 и мутаций гена *FLT3*, а также в небольшой степени – с наличием мутаций в гене *NPM1*. Эти результаты соответствуют данным других исследователей [8, 32–34].

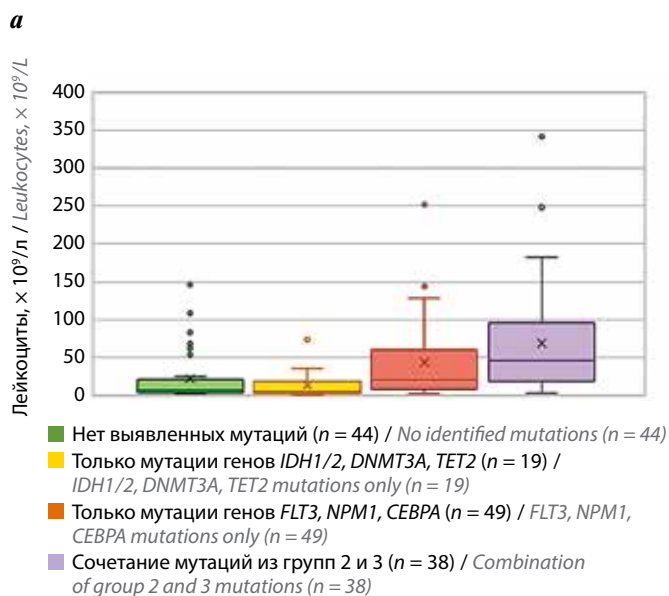
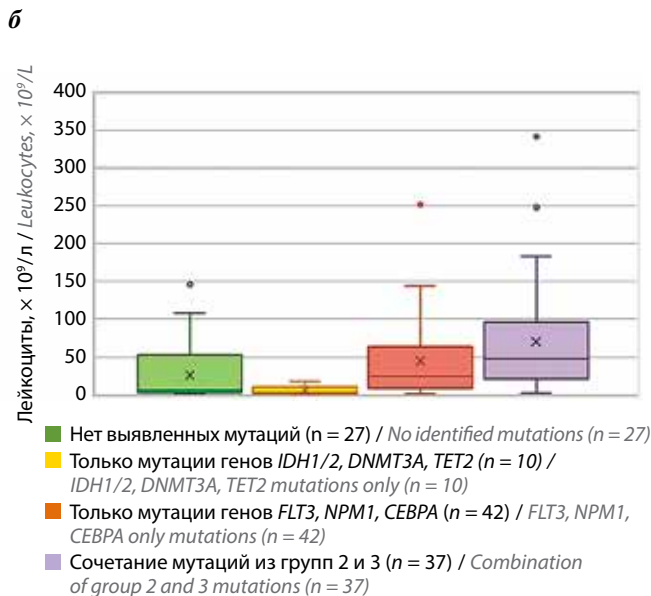


Рис. 6. Диаграммы размаха, иллюстрирующие различия по уровню лейкоцитов между группами с разным профилем мутаций у пациентов групп промежуточного и неблагоприятного цитогенетического риска (а) и у пациентов группы промежуточного цитогенетического риска (б) (критерий Краскела–Уоллиса  $p < 0,0001$ )

Fig. 6. Differences in the leukocyte level between groups of patients with different mutation landscape in patients with intermediate and unfavorable risk cytogenetics (a) and in patients with intermediate risk cytogenetics only (b). Boxplots illustrating the distribution of leukocytes in each of patient groups (Kruskal–Wallis test  $p < 0,0001$ )



Однако мы не обнаружили ассоциации мутаций в генах *CEBPA* и *DNMT3A* с развитием лейкоцитоза, в отличие от F.M. Тien и соавт. [33].

Транслокация *t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1* и неблагоприятные цитогенетические нарушения, такие как *-5/del(5q)*, *-7/del(7q)*, *-17/abn(17p)*, комплексный и моносомный кариотип, ассоциировались с низким количеством лейкоцитов. Интересно, что хотя мутации *FLT3-ITD* ассоциировались с лейкоцитозом, мы не обнаружили значимой взаимосвязи между аллельным отношением *FLT3-ITD* и количеством лейкоцитов.

Во всех представленных работах, посвященных изучению лейкоцитоза и гиперлейкоцитоза, рассматривается влияние отдельных мутаций [8, 32–34]. В нашей работе мы изучили также совокупный вклад мутаций в развитие лейкоцитоза в группе пациентов с промежуточным цитогенетическим риском. Самое высокое количество лейкоцитов выявлено у больных с одновременным выявлением мутаций генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* и мутаций генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*. Наименьшее количество лейкоцитов наблюдалось в группе пациентов только с мутациями *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2*. Таким образом, лейкоцитоз в группе промежуточного цитогенетического риска тесно связан с накоплением мутационных событий разного типа и их суммарным воздействием на опухолевый клон. Это доказывает, что в основе неблагоприятного прогностического влияния лейкоцитоза лежит в первую очередь генетический ландшафт опухолевого клона.

Известно, что повышенное количество лейкоцитов отрицательно влияет на общую и безрецидивную выживаемость как в общей когорте, так и в отдельных подгруппах ОМЛ промежуточного цитогенетического риска: *NPM1<sup>+</sup>/FLT3-ITD<sup>+</sup>*, *NPM1<sup>+</sup>/FLT3-ITD<sup>-</sup>*, *NPM1<sup>-</sup>/FLT3-ITD<sup>-</sup>*, *CEBPA<sup>adm</sup>* [8, 33, 34, 36, 37]. С другой стороны, целый ряд авторов опубликовали работы по ассоциации с неблагоприятным прогнозом одновременного выявления мутаций *DNMT3A* и *NPM1*, а также мутаций *DNMT3A*, *NPM1* и *FLT3* [6, 44, 45].

Найденная нами ассоциация высокого количества лейкоцитов в периферической крови с наличием у пациента одновременно эпигенетических мутаций *IDH1/2*,

*DNMT3A*, *TET2* и мутаций генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* также объясняет и объединяет вышеуказанные наблюдения. Высокий лейкоцитоз определяет пациентов прежде всего с сочетанием мутаций *DNMT3A* и/или *IDH1/2* и *NPM1* и/или *FLT3*, на которые пришлось 95 % наблюдений в группе 4.

Также неблагоприятные риски лейкоцитоза можно объяснить высокой прелейкемической нагрузкой, которую обеспечивают мутации *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2*. Доказано, что данные мутации генов факторов метилирования в абсолютном большинстве случаев ОМЛ носят прелейкемический характер [46–48]. Прелейкемические мутации, возникающие на уровне стволовых клеток, приводят к формированию клонов, резистентных к полихимиотерапии, которые в дальнейшем служат основой рецидивов, что отражается на долгосрочной выживаемости пациентов [46–48]. Учитывая, что лишь малая часть возможных прелейкемических событий определяется при рутинной первичной диагностике ОМЛ, а характер мутаций (прелейкемическая/лейкемическая) не всегда однозначен, высокие уровни лейкоцитов в дебюте ОМЛ у пациентов группы промежуточного цитогенетического риска могут служить косвенным маркером наличия у не только таких мутаций, как *FLT3*, *NPM1*, но и прелейкемических/эпигенетических мутаций.

### Заключение

Мутации генов *FLT3* ( $p < 0,0001$ ) и *inv(16)*, *CBFB::MYH11* ( $p = 0,0009$ ) в наибольшей степени ассоциированы с развитием лейкоцитоза  $>30 \times 10^9/\text{л}$  при ОМЛ, в то время как *t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1* и неблагоприятные цитогенетические нарушения, такие как *-5/del(5q)*, *-7/del(7q)*, *-17/abn(17p)*, комплексный и моносомный кариотип, значимо связаны с низкими уровнями лейкоцитов на момент манифестации заболевания ( $p < 0,0001$ ). В группе промежуточного цитогенетического риска лейкоцитоз ассоциирован с сочетанием мутаций генов эпигенетических факторов *IDH1/2*, *DNMT3A*, *TET2* и мутациями *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* ( $p < 0,0001$ ). Данный результат можно объяснить совокупным влиянием мутаций на пролиферативный потенциал опухолевых клеток.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Клинические рекомендации. Острые миелоидные лейкозы. Взрослые. 2020. Доступно по: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/ostrye\\_mieloidnye\\_lejkozy.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/ostrye_mieloidnye_lejkozy.pdf). Clinical recommendations. Acute myeloid leukemia. Adult. 2020. Available at: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/ostrye\\_mieloidnye\\_lejkozy.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/ostrye_mieloidnye_lejkozy.pdf). (In Russ.).
2. Khoury J.D., Solary E., Abla O. et al. The 5<sup>th</sup> edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1703–19. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1
3. Döhner H., Estey E., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4):424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196
4. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354–65. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254441

5. Grimwade D., Walker H., Harrison G. et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001;98(5):1312–20. DOI: 10.1182/blood.v98.5.1312
6. Немировченко В.С., Шервашидзе М.А., Валиев Т.Т., Кондратчик К.Л. Результаты лечения острого миелоидного лейкоза у детей с включением эпигенетических препаратов. *Онкогематология* 2020;15(2):19–28. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-2-19-28  
Nemirovchenko V.S., Shervashidze M.A., Valiev T.T., Kondratich K.L. Treatment results of pediatric acute myeloid leukemia with epigenetic drugs addition. *Onkogematologiya* = *Oncohematology* 2020;15(2):19–28. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-2-19-28
7. Kottaridis P.D., Gale R.E., Frew M.E. et al. The presence of a FLT3-internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001;98(6):1752–9. DOI: 10.1182/blood.v98.6.1752
8. Thiede C., Steudel C., Mohr B. et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002;99(12):4326–35. DOI: 10.1182/blood.v99.12.4326
9. Fröhling S., Schlenk R.F., Breitruck J. et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002;100(13):4372–80. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1440
10. Pratzcorona M., Brunet S., Nomdedéu J. et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to postremission therapy. *Blood* 2013;121(14):2734–8. DOI: 10.1182/blood-2012-06-431122
11. Schlenk R.F., Kayser S., Bullinger L. et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* 2014;124(23):3441–9. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578070
12. Linch D.C., Hills R.K., Burnett A.K. et al. Impact of FLT3(ITD) mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood* 2014;124(2):273–6. DOI: 10.1182/blood-2014-02-554667
13. Gale R.E., Green C., Allen C. et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111(5):2776–84. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090
14. Döhner K., Thiede C., Jahn N. et al. Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2020;135(5):371–80. DOI: 10.1182/blood.2019002697
15. Döhner H., Wei A.H., Appelbaum F.R. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood* 2022;140(12):1345–77. DOI: 10.1182/blood.2022016867
16. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(22):2059–74. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689
17. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol* 2017;35(9):934–46. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.2208
18. Kelly L.M., Gilliland D.G. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002;3:179–98. DOI: 10.1146/annurev.genom.3.032802.115046
19. Panuzzo C., Signorino E., Calabrese C. et al. Landscape of tumor suppressor mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Med* 2020;9(3):802. DOI: 10.3390/jcm9030802
20. Lagunas-Rangel F.A., Chávez-Valencia V., Gómez-Guijosa M.Á., Cortes-Penagos C. Acute myeloid leukemia-genetic alterations and their clinical prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2017;11(4):328–39.
21. Block M., Jacobson L.O., Bethard W.F. Preleukemic acute human leukemia. *J Am Med Assoc* 1953;152:1018–28. DOI: 10.1001/jama.1953.03690110032010
22. Medinger M., Passweg J.R. Acute myeloid leukaemia genomics. *Br J Haematol* 2017;179(4):530–42. DOI: 10.1111/bjh.14823
23. Koefler H.P., Leong G. Preleukemia: one name, many meanings. *Leukemia* 2017;31(3):534–42. DOI: 10.1038/leu.2016.364
24. Bowman R.L., Busque L., Levine R.L. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies. *Cell Stem Cell* 2018;22(2):157–70. DOI: 10.1016/j.stem.2018.01.011
25. Vergez F., Largeaud L., Bertoli S. et al. Phenotypically-defined stages of leukemia arrest predict main driver mutations subgroups, and outcome in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2022;12(8):117. DOI: 10.1038/s41408-022-00712-7
26. Kishtagari A., Levine R.L., Viny A.D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 2020;27(2):49–57. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000567
27. Genovese G., Kähler A.K., Handsaker R.E. et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* 2014;371(26):2477–87. DOI: 10.1056/NEJMoa1409405
28. Троицкая В.В., Паровичникова Е.Н., Соколов А.Н. и др. Лечение взрослых больных острыми миелоидными лейкозами с гиперлейкоцитозом в дебюте заболевания. *Терапевтический архив* 2015;87(7):33–40. DOI: 10.17116/terarkh201587733-40  
Troitskaya V.V., Parovichnikova E.N., Sokolov A.N. et al. Treatment of adult patients with acute myeloid leukemia with hyperleukocytosis at the onset of the disease. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic Archive* 2015;87(7):33–40. (In Russ.). DOI: 10.17116/terarkh201587733-40
29. Bewersdorf J.P., Zeidan A.M. Hyperleukocytosis and leukostasis in acute myeloid leukemia: can a better understanding of the underlying molecular pathophysiology lead to novel treatments? *Cells* 2020;9(10):2310. DOI: 10.3390/cells9102310
30. Stahl M., Shallis R.M., Wei W. et al. Management of hyperleukocytosis and impact of leukapheresis among patients with acute myeloid leukemia (AML) on short- and long-term clinical outcomes: a large, retrospective, multicenter, international study. *Leukemia* 2020;34(12):3149–60. DOI: 10.1038/s41375-020-0783-3
31. Greenwood M.J., Seftel M.D., Richardson C. et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006;47(7):1245–52. DOI: 10.1080/10428190600572673
32. Marcucci G., Mrózek K., Ruppert A.S. et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005;23(24):5705–17. DOI: 10.1200/JCO.2005.15.610
33. Tien F.M., Hou H.A., Tsai C.H. et al. Hyperleukocytosis is associated with distinct genetic alterations and is an independent poor-risk factor in *de novo* acute myeloid leukemia patients. *Eur J Haematol* 2018;101(1):86–94. DOI: 10.1111/ejh.13073
34. Rollig C., Ehninger G. How I treat hyperleukocytosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2015;125(21):3246–52. DOI: 10.1182/blood-2014-10-551507
35. Dutcher J.P., Schiffer C.A., Wiernik P.H. Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol* 1987;5(9):1364–72. DOI: 10.1200/JCO.1987.5.9.1364
36. De Jonge H.J., Valk P.J., De Bont E.S. et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica* 2011;96(9):1310–7. DOI: 10.3324/haematol.2011.040592
37. Lin L.I., Lin T.C., Chou W.C. et al. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid

- leukemias. *Leukemia* 2006;20(10):1899–903. DOI: 10.1038/sj.leu.2404331
38. Nakao M., Yokota S., Iwai T. et al. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10(12):1911–8.
  39. Scholl S., Mügge L.O., Landt O. et al. Rapid screening and sensitive detection of NPM1 (nucleophosmin) exon 12 mutations in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2007;31(9):1205–11. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.12.011
  40. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H. et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17(12):2318–57. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135
  41. Кашлакова А.И., Паровичникова Е.Н., Бидерман Б.В. и др. Определение молекулярно-генетического профиля у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами методом секвенирования нового поколения. *Гематология и трансфузиология* 2020;65(4):444–59. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-444-459
  - Kashlakova A.I., Parovichnikova E.N., Biderman B.V. et al. Next-generation sequencing-based molecular genetic profiling in adults with acute myeloid leukaemia. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology* 2020;65(4):444–59. (In Russ.). DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-444-459
  42. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Eds.: J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid. B.: Karger Publishers, 2016.
  43. ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Eds.: J. McGowan-Jordan, R.J. Hastings, S. Moore. B.: Karger Publishers, 2020.
  44. Bezerra M.F., Lima A.S., Piqué-Borrás M.R. et al. Co-occurrence of *DNMT3A*, *NPM1*, *FLT3* mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. *Blood* 2020;135(11):870–5. DOI: 10.1182/blood.2019003339
  45. Wakita S., Marumo A., Morita K. et al. Mutational analysis of DNMT3A improves the prognostic stratification of patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Sci* 2023;114(4):1297–308. DOI: 10.1111/cas.15720
  46. Corces-Zimmerman M.R., Hong W.J., Weissman I.L. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(7):2548–53. DOI: 10.1073/pnas.1324297111
  47. Thol F., Klesse S., Köhler L. et al. Acute myeloid leukemia derived from lympho-myeloid clonal hematopoiesis. *Leukemia* 2017;31(6):1286–95. DOI: 10.1038/leu.2016.345
  48. Corces M.R., Chang H.Y., Majeti R. Preleukemic hematopoietic stem cells in human acute myeloid leukemia. *Front Oncol* 2017;7:263. DOI: 10.3389/fonc.2017.00263

#### Вклад авторов

К.А. Пехова: разработка концепции и дизайна исследования, сбор данных пациентов (лабораторная диагностика мутаций и химерных транскриптов, сбор информации по внутренним базам данных), анализ собранной информации, подготовка текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;

Ю.В. Сидорова: выбор идеи и направления исследования, сбор данных пациентов (лабораторная диагностика мутаций и химерных транскриптов, сбор информации по внутренним базам данных), анализ собранной информации, подготовка текста статьи;

Н.А. Северина, О.А. Глинщикова: сбор данных пациентов по внутренним базам данных, лабораторная диагностика мутаций и химерных транскриптов;

И.С. Февралева, В.Н. Двирнык: сбор данных пациентов по внутренним базам данных, написание текста статьи;

Б.В. Бидерман: лабораторная диагностика мутаций и химерных транскриптов, написание текста статьи;

Ю.А. Чабаева, С.М. Куликов: статистическая обработка результатов, предоставление результатов в виде иллюстраций и таблиц;

И.А. Лукьянова: сбор данных пациентов для анализа, разработка концепции статьи, анализ данных;

А.И. Кашлакова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи;

Т.Н. Обухова: сбор цитогенетических данных пациентов и их анализ;

А.Б. Судариков: написание текста статьи, анализ полученных данных.

#### Authors' contributions

K.A. Pekhova: concept and design development, collection of patient data (laboratory diagnosis of mutations and chimeric transcripts, collection of information from internal databases), analysis of the collected information, article writing, review of publications on the article topic;

Yu.V. Sidorova: choice of idea and research direction, collection of patient data (laboratory diagnosis of mutations and chimeric transcripts, collection of information from internal databases), analysis of the collected information, article writing;

N.A. Severina, O.A. Glinshchikova: collection of patient data using internal databases, laboratory diagnosis of mutations and chimeric transcripts;

I.S. Fevralova, V.N. Dvirnyk: collection of patient data using internal databases, article writing;

B.V. Biderman: laboratory diagnosis of mutations and chimeric transcripts, article writing;

Yu.A. Chabaeva, S.M. Kulikov: statistical analysis, preparation of figures and tables;

I.A. Luk'yanova: collection of patient data for analysis, concept development, data analysis;

A.I. Kashlakova: research design development, review of publications on the article topic;

T.N. Obukhova: collection of patient cytogenetic data and their analysis;

A.B. Sudarikov: article writing, data analysis.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

К.А. Пехова / K.A. Pekhova: <https://orcid.org/0000-0002-0345-6105>

Ю.В. Сидорова / Yu.V. Sidorova: <https://orcid.org/0000-0003-1936-0084>

Н.А. Северина / N.A. Severina: <https://orcid.org/0000-0002-7036-9968>

О.А. Глинщикова / O.A. Glinshchikova: <https://orcid.org/0000-0001-7323-3639>

И.С. Февралева / I.S. Fevralova: <https://orcid.org/0000-0002-8763-246X>

Б.В. Бидерман / B.V. Biderman: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Ю.А. Чабаева / Yu.A. Chabaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8044-598X>

С.М. Куликов / S.M. Kulikov: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

И.А. Лукьянова / I.A. Luk'yanova: <https://orcid.org/0000-0002-8337-2242>

А.И. Кашлакова / A.I. Kashlakova: <https://orcid.org/0000-0002-3548-8929>

Т.Н. Обухова / T.N. Obukhova: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

В.Н. Двирнык / V.N. Dvirnyk: <https://orcid.org/0000-0002-9877-0796>

А.Б. Судариков / A.B. Sudarikov: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Funding.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики**

Протокол исследования соответствовал этическим принципам и одобрен заседанием локального этического комитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Протокол № 168 от 29.12.2022.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics**

The study protocol complied with ethical principles, and was approved by the local ethical committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 168 dated 29.12.2022.